

糖尿病肾病患者肾脏巨噬细胞 Bruton 酪氨酸激酶 激活与肾功能的相关性研究

聂振勇 赵 晶 孙璇君 吴永贵

摘要 目的 探究糖尿病肾病(DN)患者肾脏中巨噬细胞 Bruton 酪氨酸激酶(BTK)表达与肾功能的相关性。方法 收集49例经肾穿刺活检确诊为DN患者作为DN组,收集18例体检正常人血清及18例肾癌患者癌旁正常肾组织作为对照组,并观察所有纳入者的临床指标。ELISA检测对照组与DN组血清中白介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和单核细胞趋化因子(MCP)-1表达;免疫组化检测对照组与DN组肾组织TNF- α 、CD68、BTK、pBTK表达差异;激光共聚焦观察对照组与DN组的肾组织巨噬细胞与诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、p-BTK共表达。结果 与对照组相比,DN组糖化血红蛋白、血压、肌酐、尿素氮、尿酸明显升高,并且血清中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1明显升高;与对照组对比,DN组肾组织中TNF- α 表达明显增加,巨噬细胞浸润增加,BTK激活增加,并且肾脏巨噬细胞内iNOS、p-BTK表达增加;DN组肾组织BTK和p-BTK表达与24h尿蛋白、血清肌酐、血尿素氮呈正相关,与估计肾小球滤过率(eGFR)呈负相关。结论 DN患者肾脏巨噬细胞内BTK激活增加,并且与肾功能进展具有相关性。

关键词 糖尿病肾病;巨噬细胞;BTK;炎症

中图分类号 R 392.11; R 334.1; R 364.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1897-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.010

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症之一,并已成为全世界终末期肾脏疾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因^[1],目前缺乏有效的治疗手段。DN的病理学改变主要包括系膜细胞的增殖和细胞外基质的累积,基底膜的增厚,肾小管及间质的损伤和纤维化。近年来,越来越多的研究^[2]表明,巨噬细胞介导的炎症在DN中起着至关重要的作用。在DN的高血糖微环境下,巨噬细胞可以分泌多种促炎介质,其中包括白介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(tumor

necrosis factor, TNF)- α 和单核细胞趋化因子(monocyte chemotactic protein, MCP)-1^[3],进而导致肾脏内的炎症和纤维化,加速疾病的进展^[4-5]。Bruton 酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)是一种非受体酪氨酸激酶,是多种免疫受体下游细胞内信号传递的关键蛋白。已有大量研究^[6-8]表明BTK可以参与体内的多种炎症免疫反应,并参与了多种促炎介质的产生和释放。课题组前期研究^[9]表明,高糖可以诱导巨噬细胞内BTK激活,引起巨噬细胞促炎介质的释放,并且BTK敲除可以减轻炎症,缓解糖尿病小鼠的肾脏损害^[10]。在此基础上,该实验旨在研究BTK激活在DN肾脏中的重要作用,为临床的干预治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 病例资料 对照组:收集体检正常志愿者血清18例及癌旁正常肾组织18例作为对照组。DN组:收集2016年1月—2020年1月在安徽医科大学第一附属医院住院治疗的DN患者肾组织为DN组,共49例。入组标准:18~60岁、诊断符合《糖尿病肾病防治专家共识(2014年版)》的诊断标准、肾穿刺活检确诊为DN的患者。排除标准:妊娠或哺乳期妇女、合并其他继发性肾病、入组前应用激素或免疫抑制剂、近1月有泌尿系或其他系统感染病史、有其他器官严重的功能不全、恶性肿瘤患者。临床资料包括性别、年龄、糖化血红蛋白、体质指数(body mass index, BMI)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、24h尿蛋白、血清肌酐、血尿素氮、估计肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、血尿酸。所有入组者均签署知情同意书,该研究经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会审核通过。

1.2 试剂与仪器 人IL-1 β 、TNF- α 和MCP-1 ELISA试剂盒购自广州锐博生物有限公司;TNF- α 、CD68单克隆抗体购自台湾 Arigo Biolaboratories 公司;BTK、Phospho-BTK单克隆抗体购自美国 Cell

2021-08-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81470965)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:聂振勇,男,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

Signaling Technology 公司; iNOS 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 免疫组化试剂盒(PV-9000) 购自北京中杉金桥公司; 免疫荧光二抗鼠 Alexa Fluor 594 和兔 Alexa Fluor 488 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 激光共聚焦显微镜 LSM880 购自德国 Leica 公司。病理切片标准: 肾小球数目 ≥ 8 个, 经 2 位病理专家独立诊断确诊为 DN。病理评级参考肾脏病理学会(RPS) 2010 年发表的糖尿病肾病的病理分类^[11]。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 实验 收集各组血清, 并通过 ELISA 检测各组血清中 IL-1 β , TNF- α 和 MCP-1 表达, 检测步骤参考说明书进行。

1.3.2 免疫组化实验 肾组织切片常规脱蜡至水化, 依次经内源性过氧化物酶阻断剂封闭, 高压法修复抗原, 10% 山羊血清封闭, 滴加一抗 TNF- α (1 : 200)、CD68 (1 : 200)、BTK (1 : 400) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (大于 8 h), 冲洗后滴加二抗 (辣根酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 冲洗后进行 DAB 显色。所有切片在显微镜下随机拍摄 10 个视野, 通过 Image J 软件进行半定量分析, 计算棕色阳性位点或棕色阳性面积占比, 最后计算出各组平均值用于统计学分析。

1.3.3 免疫荧光实验 肾组织切片常规脱蜡至水化, 依次经内源性过氧化物酶阻断剂封闭, 高压法修复抗原, 10% 山羊血清封闭, 滴加一抗 CD68 (1 : 200)、iNOS (1 : 200)、BTK (1 : 400)、p-BTK (1 : 200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 冲洗后滴加二抗 (抗小鼠 Alexa Fluor 594 和抗兔 Alexa Fluor 488), 室温下避光孵育 2 h, DAPI 染核 10 min, 甘油封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析, 正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。线性相关分析采用 Pearson 检验或 Spearman 检验。使用 Levene 方法进行方差齐性检验, 正态分布定量资料组间差异比较选用 t 检验, 定性资料组间差异选择 χ^2 检验, 非正态分布资料组间差异比较选用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床指标 与对照组相比, DN 组糖化血红蛋白、SBP、DBP、MAP、24 h 尿蛋白、血清肌酐、血尿素氮、血尿酸明显升高, eGFR 明显下降, 差异有

统计学意义 ($t_{\text{糖化血红蛋白}} = 7.726$, $t_{\text{SBP}} = 2.959$, $t_{\text{DBP}} = 2.219$, $t_{\text{MAP}} = 2.828$, $Z_{24\text{h尿蛋白}} = -6.083$, $Z_{\text{血清肌酐}} = -5.333$, $t_{\text{血尿素氮}} = 4.894$, $t_{\text{血尿酸}} = 4.240$, $t_{\text{eGFR}} = 6.394$, 均 $P < 0.05$); 年龄、性别及 BMI 差异无统计学意义。见表 1。

表 1 对照组及 DN 组的一般临床指标比较 [$\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$]

项目	对照组 (n=18)	DN 组 (n=49)	F 值	P 值
男/女	10/8	34/15	1.445	0.153
年龄 (岁)	45.67 \pm 10.27	49.12 \pm 8.04	1.117	0.291
糖化血红蛋白 (%)	4.49 \pm 0.66	7.56 \pm 1.63	7.726	<0.001
BMI (kg/m ²)	3.25 \pm 0.47	3.43 \pm 0.43	1.513	0.135
SBP (kPa)	17.20 \pm 0.35	19.21 \pm 2.77	2.959	0.004
DBP (kPa)	10.62 \pm 1.02	11.58 \pm 1.73	2.219	0.030
MAP (kPa)	12.81 \pm 1.01	14.13 \pm 1.87	2.828	0.006
蛋白尿 (g/24 h)	0.07 \pm 0.05	2.63 (0.08, 13.32)	-6.083	<0.001
血清肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	57.98 \pm 17.09	104.00 (58.78, 312.92)	-5.333	<0.001
血尿素氮 (mmol/L)	4.92 \pm 0.95	8.75 \pm 3.26	4.894	<0.001
eGFR [ml/(min \cdot 1.73 m ²)]	119.00 \pm 11.19	72.45 \pm 30.01	6.394	<0.001
血尿酸 (mmol/L)	293.22 \pm 32.71	379.98 \pm 84.16	4.240	<0.001

2.2 各组血清及肾脏中炎症变化 ELISA 结果显示, 与对照组相比, DN 组血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 均明显升高, 差异有统计学意义 ($t_{\text{TNF-}\alpha} = 3.868$, $t_{\text{IL-1}\beta} = 3.088$, $t_{\text{MCP-1}} = 13.690$, 均 $P < 0.05$), 提示 DN 患者血清中炎症介质增加。见图 1A。免疫组化结果显示, DN 组肾脏中 TNF- α 表达高于对照组 ($t_{\text{TNF-}\alpha} = 3.418$, $P < 0.05$), 提示 DN 患者肾组织中炎症同样增加。见图 1B。

2.3 各组肾组织 CD68、BTK、p-BTK 表达变化 免疫组化结果显示, 相较于对照组, DN 组肾小球和肾小管中的 CD68、BTK 和 p-BTK 表达均明显增加 ($t_{\text{CD68球}} = 5.774$, $t_{\text{CD68间质}} = 6.119$, $t_{\text{BTK球}} = 4.542$, $t_{\text{BTK间质}} = 7.315$, $t_{\text{p-BTK球}} = 6.760$, $t_{\text{p-BTK间质}} = 7.610$, 均 $P < 0.05$), 提示 DN 患者肾组织中巨噬细胞浸润增加, 并伴有 BTK 表达与激活增加。见图 2。

2.4 各组肾组织 CD68 与 iNOS、p-BTK 共表达 激光共聚焦结果显示, 与对照组相比, DN 组肾脏内巨噬细胞浸润增加, 并且巨噬细胞内 iNOS 与 p-BTK 表达增加, 提示 DN 肾脏中巨噬细胞激活, 并且 BTK 磷酸化参与了该过程。见图 3。

2.5 DN 组肾脏 BTK 表达与临床指标的相关性分析 该实验将年龄、性别、糖化血红蛋白、SBP、DBP、MAP 及血尿酸作为控制因素, 分别对肾小球及肾小管间质内 BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐及血尿素氮进行线性相关分析。结果显示, DN 组

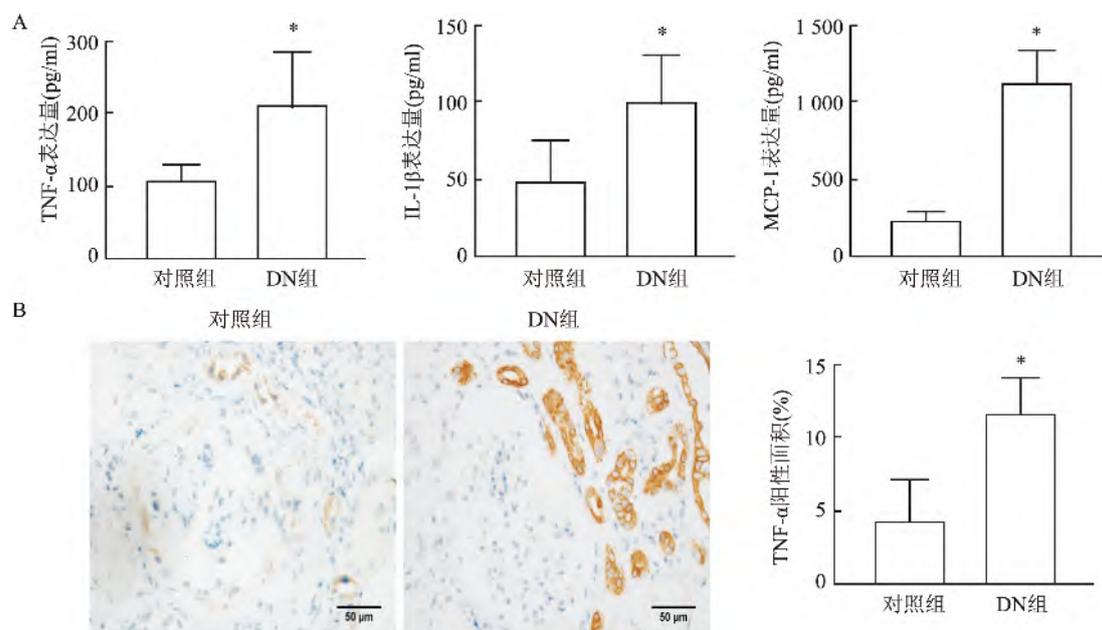


图1 各组血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 表达及肾脏中 TNF- α 表达差异

A: ELISA 检测各组血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 表达变化; B: 免疫组化检测各组肾组织中 TNF- α 表达变化 $\times 400$; 与对照组比较: * $P < 0.05$

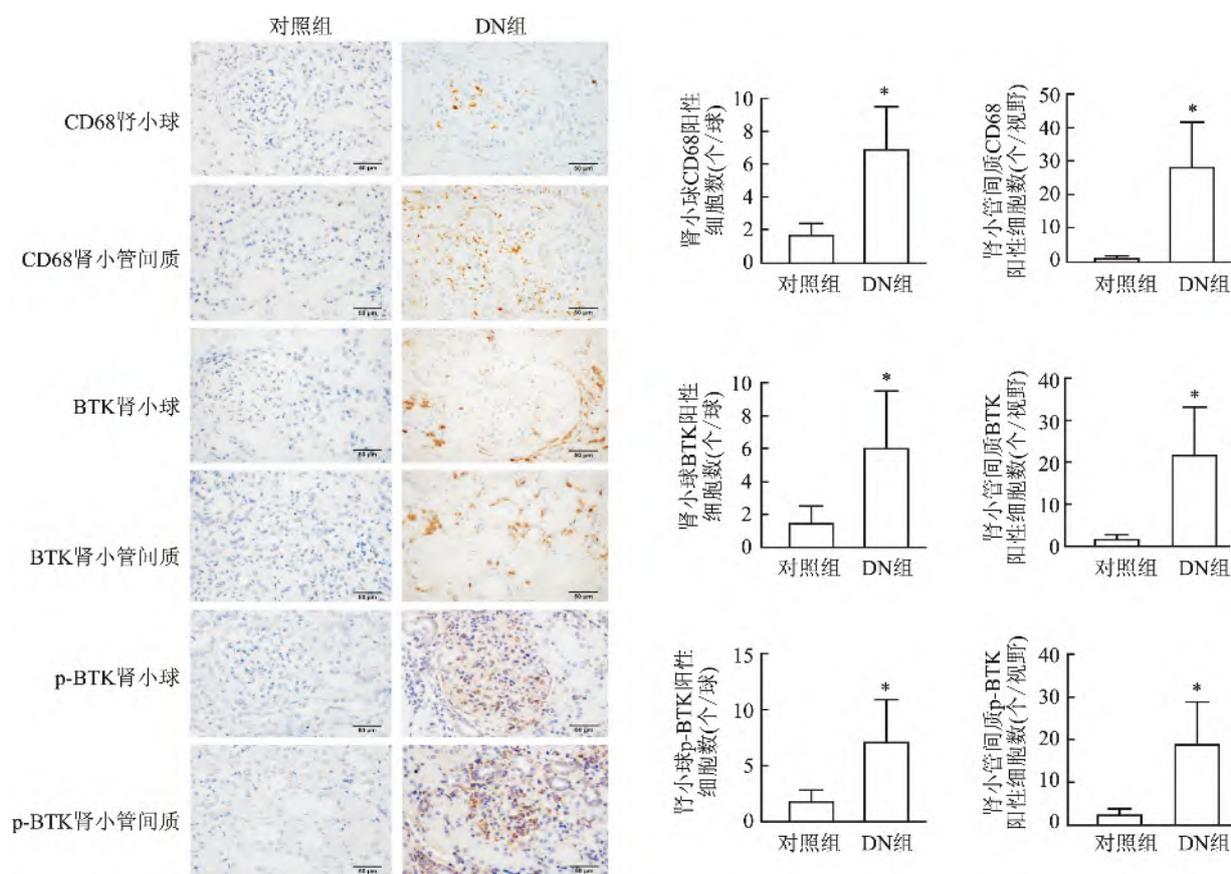


图2 各组肾组织中 CD68、BTK 及 p-BTK 表达变化 $\times 400$

免疫组化检测各组肾小球及肾小管间质中 CD68、BTK 及 p-BTK 表达变化; 与对照组比较: * $P < 0.05$

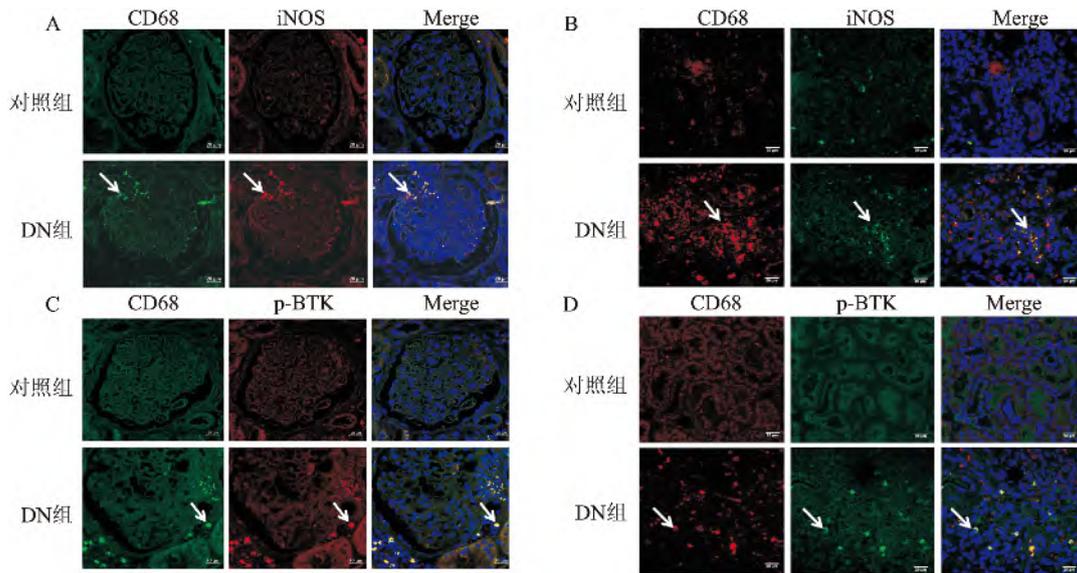


图3 DN组肾组织中CD68与iNOS、p-BTK共表达 ×400

A: 激光共聚焦检测各组肾小球中CD68与iNOS共表达; B: 激光共聚焦检测各组肾小管间质中CD68与iNOS共表达; C: 激光共聚焦检测各组肾小球中CD68与p-BTK共表达; D: 激光共聚焦检测各组肾小管间质中CD68与p-BTK共表达

肾小球 BTK 表达与 24 h 尿蛋白 ($R = 0.511, P < 0.001$)、血清肌酐 ($R = 0.339, P = 0.026$) 呈正相关,与 eGFR 呈负相关 ($R = -0.386, P = 0.011$),肾小球内 BTK 表达与血尿素氮无明显相关性 ($R = 0.191, P = 0.220$);同时,肾小管间质内 BTK 表达与 24 h 尿蛋白 ($R = 0.550, P < 0.001$)、血清肌酐 ($R = 0.453, P = 0.002$) 及血尿素氮 ($R = 0.355, P = 0.019$) 也呈正相关,与 eGFR 呈负相关 ($R = -0.451, P = 0.002$),提示肾脏内 BTK 的表达与 DN 患者的临床指标具有显著的相关性。见图 4。

2.6 DN 组肾脏 p-BTK 表达与临床指标的相关性分析 该实验对肾小球及肾小管间质内 p-BTK 的表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐及血尿素氮进行线性相关分析。结果显示, DN 组肾小球 p-BTK 表达与 24 h 尿蛋白 ($R = 0.671, P < 0.001$)、血清肌酐 ($R = 0.482, P = 0.001$) 及血清尿素氮 ($R = 0.421, P = 0.004$) 均呈正相关,与 eGFR 呈负相关 ($R = -0.458, P = 0.002$);同时,肾小管间质内 p-BTK 表达与 24 h 尿蛋白 ($R = 0.552, P < 0.001$)、血清肌酐 ($R = 0.455, P = 0.002$) 及血尿素氮 ($R = 0.359, P = 0.017$) 也呈正相关,与 eGFR 呈负相关 ($R = -0.454, P = 0.002$) 提示肾脏内 BTK 的磷酸化激活与 DN 患者的临床指标同样具有很强的相关性。见图 5。

3 讨论

随着社会的发展,糖尿病的患病率呈逐年上升

的趋势。目前全球有 4.15 亿人患有糖尿病,估计有 1.93 亿人未诊断出糖尿病。2 型糖尿病占糖尿病患者的 90% 以上^[12],并且大约 30% ~ 40% 的糖尿病患者会发展为肾病。DN 给患者及社会都带来了严重的经济负担,因此,其预防与治疗成为目前亟需解决的难题。

DN 的发病机制复杂,目前大多认为是由于机体的高血糖微环境导致代谢及血流动力学的紊乱引起了肾脏疾病,但随着研究的深入,大量研究^[4]表明炎症在 DN 的整个病程期间均起着重要作用,并决定着疾病的发展方向。高糖环境下可诱导多种炎症细胞(包括巨噬细胞、T 细胞、肥大细胞)浸润,其中巨噬细胞在 DN 患者的肾脏活检组织和实验动物模型肾组织均有发现浸润,并且巨噬细胞浸润程度与肾损害的严重程度和纤维化程度相关^[13]。巨噬细胞可通过多种机制介导肾损伤,包括活性氧 (ROS)、细胞因子和蛋白酶等的产生,这些损伤介质可以导致肾脏的炎症并最终引起纤维化改变。该研究表明, DN 患者血清中促炎介质表达升高,并且 DN 患者肾组织中 TNF- α 表达增加,巨噬细胞浸润及激活增加。DN 患者血清中的促炎趋化因子可以招募巨噬细胞进入肾脏,同时高糖环境可以诱导巨噬细胞的激活,引起肾脏内炎症的增加进而参与疾病的进展。

Bruton 酪氨酸激酶 (BTK) 是 Tec 胞质酪氨酸激酶家族的成员,主要在髓系造血细胞中表达^[14]。除了其在 B 细胞中的重要调控作用外, BTK 还参与

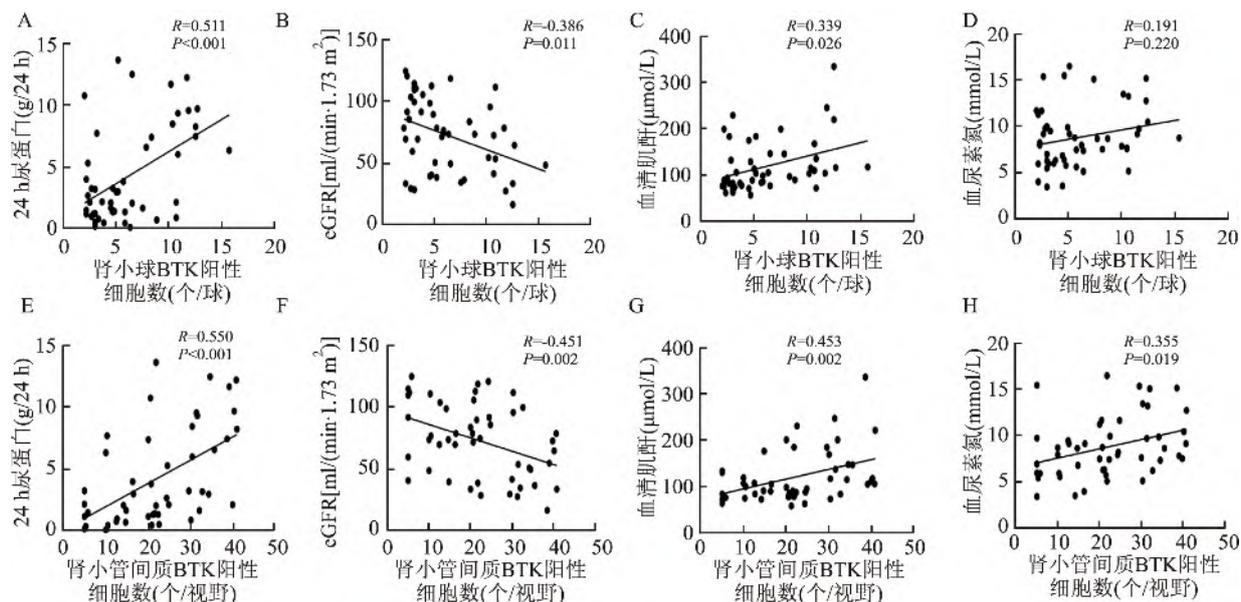


图4 DN 组肾小球及肾小管间质中 BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮相关性分析

A ~ D: 分别表示 DN 组肾小球中 BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮的相关性分析; E ~ H: 分别表示 DN 组肾小管间质中 BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮的相关性分析

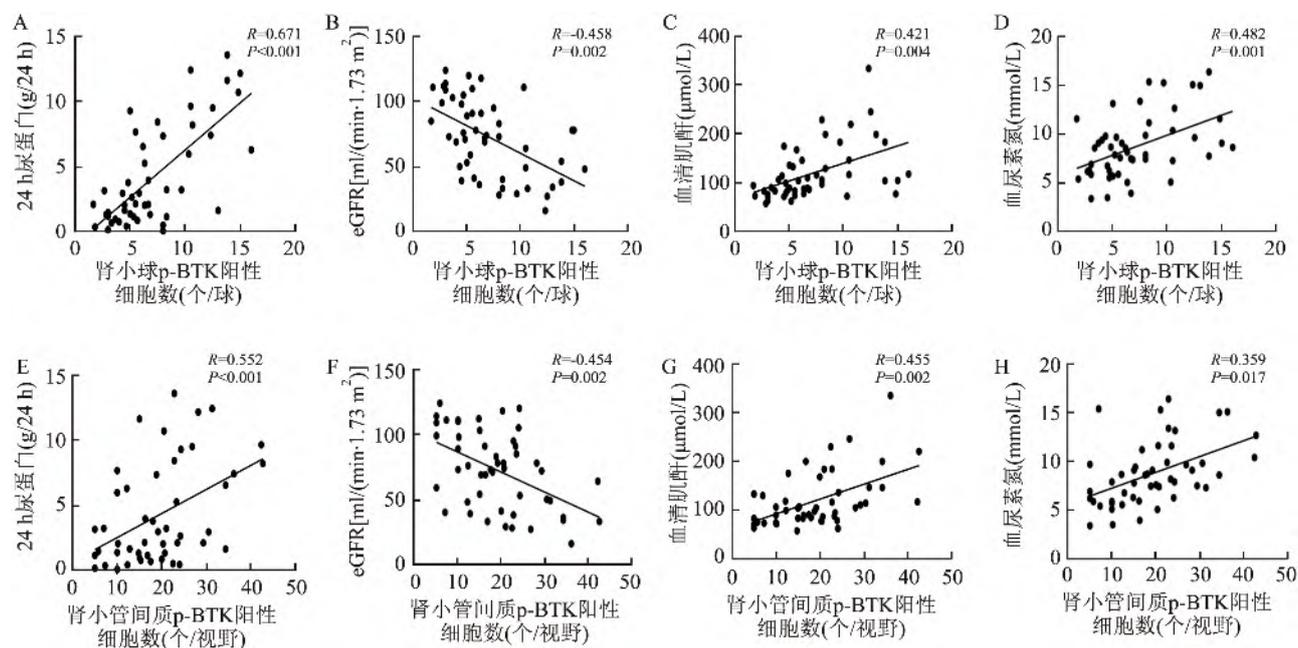


图5 DN 组肾小球及肾小管间质中 p-BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮相关性分析

A ~ D: 分别表示 DN 组肾小球中 p-BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮的相关性分析; E ~ H: 分别表示 DN 组肾小管间质中 p-BTK 表达与 24 h 尿蛋白、eGFR、血清肌酐、血尿素氮的相关性分析

调节巨噬细胞活化和促炎性细胞因子产生的 Toll 样受体 (TLR) 信号通路,而后者在 DN 的进展中起着重要作用^[15-16]。课题组前期研究^[9-10]表明,高糖可以激活骨髓来源的巨噬细胞中 BTK 表达,并且通过激活下游的 NF-κB 信号通路,进而诱导促炎介质的释放,而 BTK 抑制后可以减轻该过程。该研究结

果显示, DN 患者肾组织中 BTK 的表达与激活增加,并且免疫荧光共标结果显示, BTK 可以在巨噬细胞中激活。通过进一步的数据分析,研究表明 DN 组肾组织中肾小球和肾小管内 BTK 及 p-BTK 的表达均与 24 h 尿蛋白和血清肌酐呈正相关,与肾小球滤过率呈负相关,并且肾小管间质中的 BTK 表达与血

尿素氮呈正相关,肾小球及肾小管间质中 p-BTK 的表达均与血尿素氮呈正相关。这提示 BTK 介导的炎症反应在 DN 的疾病进程中有着重要的作用, BTK 可以作为 DN 的潜在治疗靶点。

DN 目前缺乏有效的治疗手段,而减轻肾组织的炎症对于延缓疾病的进程有着重要的作用。该研究表明 DN 患者微循环和肾脏内炎症的增加,并且该过程与巨噬细胞和 BTK 的激活有着重要的联系。BTK 的表达与 DN 患者的临床指标有着重要的相关性。该研究具有重要的临床意义且可能为 DN 的治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA consensus conference [J]. *Am J Kidney Dis* 2014 64(4): 510-33.
- [2] 覃艳,孙林,刘伏友,等. 巨噬细胞介导的免疫炎症反应与糖尿病肾病关系的研究进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2017, 33(3): 236-40.
- [3] Klessens C Q F, Zandbergen M, Wolterbeek R, et al. Macrophages in diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2017 32(8): 1322-9.
- [4] You H, Gao T, Cooper T K, et al. Macrophages directly mediate diabetic renal injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013 305(12): F1719-27.
- [5] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. Inflammatory processes in renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol* 2014 10(9): 493-503.
- [6] Goess C, Harris C M, Murdock S, et al. ABBV-105, a selective and irreversible inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, is efficacious in multiple preclinical models of inflammation [J]. *Mod Rheumatol* 2019 29(3): 510-22.
- [7] Florence J M, Krupa A, Booshehri L M, et al. Inhibiting Bruton's tyrosine kinase rescues mice from lethal influenza-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018 315(1): L52-8.
- [8] 杨帆,董婧涵,李会,等. BTK 抑制剂 GDC-0853 通过 TLR4/NF- κ B 通路抑制 M1 巨噬细胞极化并改善 UUO 肾损伤 [J]. *免疫学杂志*, 2021 37(2): 107-14.
- [9] Fan Z, Wang Y, Xu X, et al. Inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, PCI-32765, decreases pro-inflammatory mediators production in high glucose-induced macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018 58: 145-53.
- [10] 郑智超,范哲,吴永贵. 巨噬细胞 Bruton 酪氨酸激酶基因特异性敲除减轻糖尿病小鼠肾脏损害的作用及机制 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2020 36(2): 131-8.
- [11] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol* 2010 21(4): 556-63.
- [12] Chatterjee S, Khunti K, Davies M J. Type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2017 389(10085): 2239-51.
- [13] Hickey F B, Martin F. Diabetic kidney disease and immune modulation [J]. *Curr Opin Pharmacol* 2013 13(4): 602-12.
- [14] 刘晓庆,鲁桓兵,宋育林,等. Bruton 酪氨酸激酶在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤中变化及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020 55(8): 1180-4.
- [15] Koprulu A D, Ellmeier W. The role of Tec family kinases in mononuclear phagocytes [J]. *Crit Rev Immunol*, 2009 29(4): 317-33.
- [16] 段分分,杨雯雯,吴永贵,等. 芍药苷对糖尿病小鼠肾组织中 TLR2 信号通路的调节作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018 53(8): 1252-9.

Correlation analysis between renal macrophage-derived Bruton tyrosine kinase expression with renal function in patients with diabetic nephropathy

Nie Zhenyong, Zhao Jing, Sun Xuanjun, et al

(Dept of Nephropathy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the relationship between the expression of macrophage-derived Bruton's tyrosine kinase (BTK) with renal function in the kidneys of patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** 49 patients with DN diagnosed by renal biopsy were collected as the DN group. 18 normal human serum and 18 normal kidney tissues adjacent to the cancer in patients with kidney cancer were collected as a control group. Clinical indicators of all participants were collected. The expression of interleukin (IL) -1β , tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ and monocyte chemotactic protein (MCP) -1 in the serum of the control group and the DN group was detected by ELISA. The expression of TNF- α , CD68, BTK and p-BTK in renal tissues of the control group and the DN group was detected by immunohistochemistry. Laser confocal was performed to observe the co-expression of inducible carbon monoxide synthase (iNOS) and p-BTK in kidney tissue macrophages in the control group and the DN group.

网络出版时间: 2021-11-25 9:03 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1046.011.html>

绿茶提取物 EGCG 预防龋病的动物实验研究

李芳¹, 刘亚军¹, 刘泽婷¹, 陈永翔¹, 王烈成², 王一君³, 王元银¹

摘要 目的 通过大鼠龋齿模型探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对龋病的预防效果,为天然药物EGCG预防龋病的临床研究提供试验和理论依据。方法 选择SD大鼠24只,随机分成EGCG、氟化钠(NaF)、醋酸氯己定(CHX)及蒸馏水(对照)组,每组6只。接种变形链球菌(*S. mutans*)标准菌株并给予致龋饲料2000#和5%蔗糖水,分别用浓度为最小抑菌浓度(MIC)的EGCG、250 mg/L NaF溶液、0.12% CHX溶液及蒸馏水对大鼠口腔进行冲洗涂药。连续处理6周后处死大鼠,收集大鼠颌骨,Keyes记分法分析,评估大鼠上颌磨牙患龋情况。结果 经龋齿Keyes记分显示与对照组相比,各组药物对大鼠龋齿的形成和严重程度均有不同程度的抑制效果,其中EGCG组显示对大鼠上颌窝沟面龋的釉质龋($P < 0.01$)及牙本质龋均有较好的防治效果,对牙本质深龋的防治效果更好($P < 0.001$)。但对牙本质浅、中龋的防治效果低于CHX组。结论 MIC浓度的EGCG降低龋齿的发生率和严重程度,对大鼠龋损发生

具有较好的抑制作用。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯; EGCG; 变形链球菌; SD大鼠; 龋病

中图分类号 R 781.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1903-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.011

龋病是一种细菌感染性疾病,由含有变形链球菌(*streptococcus mutans*, *S. mutans*)的口腔生物膜诱导下牙体硬组织发生的病变。现有研究^[1]表明大量的致龋细菌是龋病的致病因素,而*S. mutans*是龋病的主要病原微生物。*S. mutans*黏附于牙面获得性膜上,迅速繁殖、代谢碳水化合物产酸,溶解牙体硬组织进而形成龋洞,这是其致龋特性^[2]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)在儿茶素中含量最多,具有广泛的生物学和药理活性。它还具有较高的抗龋功效,这一特性主要来源于它的抗菌活性,其作用机制与它的化学结构有关^[3-5]。有研究^[6]表明,EGCG对口腔主要致龋细菌的产酸、耐酸以及黏附等致龋毒力因子有较好的抑制作用。且有学者证实^[7]EGCG在抑菌、保护神经系统及抗氧化等方面起重要作用。该课题前期研究^[8]表明EGCG对*S. mutans*的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为6.25 mg/L。该研究利用大鼠龋病模型对绿茶提取物EGCG在MIC时的防龋效能进行综合评估,为绿茶提取物EGCG进入临床试验提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 EGCG、氨苄西林钠购自北京索

2021-08-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271162); 安徽省人口健康领域项目(编号: 201904a07020062); 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金资助项目(编号: SKLTOF20160110)

作者单位: 安徽医科大学¹口腔医学院、²基础医学院生理学教研室 合肥 230032

³安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036

作者简介: 李芳, 女, 硕士研究生;

王烈成, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangliecheng@ahmu.edu.cn;

王一君, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yijun@ahau.edu.cn;

王元银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

Results Compared with the control group, the levels of HbA1c, blood pressure, creatinine, urea nitrogen and uric acid in DN group significantly increased, and the levels of serum inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and MCP-1 significantly increased. Compared with the control group, the expression of TNF- α , the infiltration of macrophages and the activation of BTK significantly increased in DN group, and the expressions of iNOS and p-BTK in renal macrophages also increased. In DN group, BTK and p-BTK expression were positively correlated with 24 hour urinary protein, serum creatinine and blood urea nitrogen, and negatively correlated with estimated glomerular filtration rate (eGFR). **Conclusion** The activation of BTK in renal macrophages is increased in DN patients and is correlated with renal function progression.

Key words diabetic nephropathy; macrophages; BTK; inflammation